Vestnik zoologii, **40**(1): 49—53, 2006

УДК 575.17:597.851

ОСОБЕННОСТИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ В ГИБРИДНОМ КОМПЛЕКСЕ *RANA ESCULENTA* (AMPHIBIA, RANIDAE)

И. И. Козиненко, Е. И. Жалай, Н. С. Заводникова

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины,
ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01601 Украина
E-mail: zhalai@ukr.net

Принято 18 августа 2005

Особенности аллотрансплантации в гибридном комплексе *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae). Козиненко И. И., Жалай Е. И., Заводникова Н. С. — Для решения вопросов формирования гибридного комплекса *Rana esculenta* применен иммуногенетический метод пересадки кожи, позволяющий определять изменчивость гибридов и родительских видов по уровню гистосовместимости. Наиболее гетерогенными по антигенам тканевой совместимости являются виды. Гибриды аллодиплоиды отличаются длительной латентной фазой и снижением уровня не только аллозимной изменчивости, но и по антигенам гистосовместимости. Однако скорость отторжения аллографтов у гибридов F_1 выше, что может быть вызвано явлением гетерозиса и иммунным статусом в целом.

Ключевые слова: *Rana esculenta* complex, гибрид аллодиплоид, аллографт, пересадка кожи.

Peculiarities of Allotransplantation Within the Hybrid Complex of *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae). Kozinenko I. I., Zhalai Ye. I., Zavodnikova N. S. — For purposes of unravelling the development of the hybrid complex of *Rana esculenta* an immunogenetic method of skin transplantation was applied for assessing the variability of hybrids and parental species according to levels of expressed histocompatability. The most heterogenic ones with respect to antigens of tissue compatability turned out to be species. Allodiploid hybrids are distinguished by a prolonged latent phase and a decreased level of allozyme variability and of antigen histocompatability as well. However, the rate of the allograft rejection in F_1 hybrids is higher and may be a result of heterosis and could be depending on the overall immune status of the animals.

Key words: *Rana esculenta* complex, hybrid allodiploid, skin transplantation.

Введение

Одним из самых известных случаев естественной гибридизации среди позвоночных животных является та, которая происходит между двумя западнопалеарктическими видами зеленых лягушек рода *Rana*: озерной (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) и прудовой (*R. lessonae* Camerano, 1882). Интерес к возникающему в результате этой гибридизации комплексу *Rana esculenta* не ослабевает с момента его открытия (Berger, 1966) в связи с многообразием генетических последствий, сопровождающих этот процесс. Во-первых, это необычный способ репродукции — полуклональное размножение, при котором на стадии созревания гамет происходит элиминация одного из родительских геномов (Tunner, 1974), причем как прудовой лягушки, так и озерной (Морозов-Леонов, 1998). Элиминация может быть полной или неполной, при этом часть теряемого генома может сохраняться в виде интрогрессий в хромосомах другого вида (Межжерин, Морозов-Леонов, 1994). Во-вторых, это различная плоидность гибридов, которые могут быть аллодиплоидами или аллотриплоидами состава LLR (с удвоенным геномом прудовой лягушки) или RRL (озерной) (Günther, 1970). Все эти явления, присущие данному комплексу, приводят к появлению популяций, чрезвычайно разнообразных по своей генетической структуре и требующих изучения на адекватном методическом уровне. Обычно применяют кариотипирование, биохимическое генное маркирование и анализ изменчивости ДНК (Hepich, Tunner, 1979; Межжерин, Песков, 1992; Mazin, Borkin, 1979).

Наличие у лягушек рода *Rana* области, генетически гомологичной главному комплексу гистосовместимости теплокровных животных, а следовательно, и свойственной ему реакции отторжения немедленного типа, позволяет проводить исследование структуры популяции с привлечением иммуногенетического метода пересадки тканей. Получены данные (Płytycz, 1984), доказывающие, что

виды земноводных различаются по уровню полиморфизма главного комплекса гистосовместимости (МНС). У лягушек рода *Rana* количество аллелей МНС является одним из самых высоких среди амфибий (Góralik et al., 1994), поэтому метод трансплантации обладает высокой разрешающей способностью. Кроме того, еще одним немаловажным достоинством этого метода является возможность не наносить урон популяциям при их изучении, поскольку исследования проводятся прижизненно.

Целью настоящего исследования является предварительная оценка уровня гетерогенности видов и гибридной формы лягушек комплекса *Rana esculenta* по антигенам главного комплекса гистосовместимости.

Материал и методы

Исследование проведено на европейских зеленых лягушках комплекса *Rana esculenta*: озерной — *R. ridibunda*, прудовой — *R. lessonae*, а также на аллодиплоидных гибридах *R. lessonae* × *R. ridibunda* = *R.* kl. *esculenta* (Dubois, Günther, 1982). Животные отловлены в системе озер и запруд р. Нивка, окр. Киева (п. Новобеличи). Данная гибридная популяция характеризуется как популяция REL-типа, где присутствуют оба вида и гибрид. Всего исследовано: 12 ос. озерных (RR), 19 ос. прудовых (RL) лягушек и 14 ос. гибридов (RE). Пересажено и проанализировано 90 графтов.

После поимки животных содержали при температуре (20 ± 2)°С на сфагнуме в емкостях с небольшим количеством отстоянной воды. Их дважды в неделю кормили сырой говяжьей печенью и 3 раза в неделю меняли воду. После двух недель акклиматизации к лабораторным условиям проводили пересадку графтов путем перекрестной замены между случайно (x, y) выбранными животными одного вида. За основу нами взят классический метод трансплантации тканей (Hildeman, Haas, 1959), разработанный на головастиках *R. catesbeiana* и модифицированный для лягушек, прошедших метаморфоз (Płytycz, Semik, 1980 и др.). Эксперимент сведен к трем сериям опытов по аллотрансплантации: вариант А — $RR_x \leftrightarrow RR_y$; вариант В — $RL_x \leftrightarrow RL_y$; вариант С — $RE_x \leftrightarrow RE_y$. Одновременно ставили контроль на аутотрансплантацию ($x_1 \leftrightarrow x_1$; $y_1 \leftrightarrow y_1$).

У каждой лягушки под наркозом (3-aminobenzoid acid ethil ester) в асептических условиях были взяты спинные фрагменты кожи (около 9 мм^2), на место которых трансплантированы аналогичные донорские фрагменты. Графты (один аллографт и один аутографт) располагали ортопично по обе стороны между дорсально-медиальной полосой и боковым валиком. После этого животное помещали на 2 сут в индивидуальный контейнер небольших размеров, не позволявший активно двигаться. За указанный период трансплантаты крепко прирастали, и никаких специальных приспособлений для их удержания не требовалось. После визуального контроля успешности приживления графтов животных помещали в стационарные емкости попарно. Реакцию учитывали при 3-кратном увеличении 3 раза в неделю, а в переломные моменты отторжения — ежедневно. Общепринято оценивать трансплантационный ответ на качественном уровне (Каунат, 1979). Критерием служат начало и конец деструктивных изменений. Мы оценивали ответ количественно (в баллах) для дальнейшей статистической обработки. При этом выделяли следующие градации реакции отторжения: 0 — графт прочно прирос, 1 — незначительное припухание, 2 — графт приподнят, 3 — приподнят и/или изменил цвет, 4 — частично некротизирован, 5 — некроз и начало отторжения, 6 — графт полностью отторгнут.

По данным литературы, день окончательного исчезновения естественной окраски пересаженного участка кожи считается концом процесса трансплантации (Semik, 1983). Мы продолжали наблюдение за всеми особями до отторжения аллографтов, которое проявлялось в полном исчезновении трансплантата путем лизиса. Различия в реакции между самцами и самками не обнаружены.

Результаты эксперимента оценивали по нескольким показателям: продолжительности латентной фазы, времени выживания и скорости отторжения графта. Последний показатель (введенный нами) отражает нарастание силы некротической реакции. Данные обработаны статистически.

Результаты и обсуждение

Фрагменты кожи донора прирастали к телу реципиента уже на второй послеоперационный день. Вначале промежуток между графтом и кожей хозяина был заполнен экссудатом. В некоторых случаях травматические изменения были видны несколько дней после операции. Постепенно они исчезали, а трансплантаты приобретали здоровый внешний вид. Аутографты полностью прижились, и изменения не наблюдались за весь период наблюдения (более трех месяцев). Напротив, аллографты обнаруживали симптомы деструкции, которые становились видимыми после латентного периода, во время которого все графты имели здоровый вид.

Посветление графта и некротические изменения в пигментации начинаются с периферии, где отмечаются симптомы деструкции ткани. С усилением реакции отторжения наблюдается припухлость и (у некоторых особей) геморрагия. Есте-

ственная окраска пересаженного участка кожи окончательно исчезает. Максимальный срок лизиса аллографтов среди всех исследованных особей наступил на 97-е сут. Результаты экспериментов по пересадке кожи у зеленых лягушек RR, RL и RE продемонстрированы в таблице 1 и на рисунке 1.

Процесс распознавания чужеродных антигенов главного комплекса гистосовместимости у зеленых лягушек всех трех генетических форм идет по общей схеме: от приживления до полного отторжения. Различия касаются скорости распознавания «свое—чужое». У гибридов *R.* kl. *esculenta* длительность латентной фазы превосходит таковую озерной (*R. ridibunda*) и прудовой (*R. lessonae*) лягушек.

Биохимическое генное маркирование, проведенное на зеленых лягушках, характеризует озерную как вид с высокой генетической изменчивостью (Межжерин, Песков, 1992). Наши данные также свидетельствуют о гетерогенности данного вида, поскольку отторжение аллотрансплантатов в группе озерных лягушек наступает на 10-е сут (у прудовой лягушки и гибрида соответственно на 11-е и 16-е сут).

Однако теми же авторами показана невысокая аллозимная изменчивость прудовой лягушки. Напротив, в опытах по аллотрансплантации не отмечено снижение ее гетерогенности по антигенам гистосовместимости, этот вид характеризуется изменчивостью, сопоставимой с таковой озерной лягушки. Замедление процесса распознавания недостоверное. Высокий полиморфизм аллелей гистосовместимости внутри популяции *R. lessonae* отмечают и другие авторы (Semik, 1983).

По длительности латентного периода гибриды достоверно отличаются, причем как от озерной, так и прудовой лягушки. В среднем она составляет 17,6, 20,1 и 23,1 сут для RR, RL и RE соответственно.

По аллотрансплантации кожи у зеленых лягушек гибридного комплекса *Rana esculenta* имеются единичные работы (Semik, 1983). Авторы исследовали зеленых лягушек из природных популяций южной части Польши. Несмотря на то, что в первую очередь их интересовали вопросы филогенеза иммунного ответа, можно провести сравнение результатов. Так, авторы отмечают, что латентная фаза в группе RE↔RE была более продолжительной, нежели у родительских видов, что справедливо и для гибридов из Киевской обл.

Отличия в первую очередь касаются скорости отторжения. В новобеличанской популяции RR, RL и RE лягушки достоверно не различаются по времени выживания аллографтов, несмотря на большую продолжительность латентного периода у гибридов. Следовательно, скорость отторжения в группе гибридов после распознавания чужеродных антигенов гистосовместимости превышает таковую у родительских видов (рис. 1).

Скорость отторжения аллографтов у гибридов из южнопольской популяции меньше, чем у прудовой и озерной лягушек этой же популяции. У трансплан-

Таблица 1. Динамика отторжения кожных аллографтов у зеленых лягушек рода *Rana* и их гибридов
Table 1. Dynamics of the rejection of skin allografts in *Rana* waterfrogs and their hybrids

Показатель	*R. ridibunda*	*R. lessonae*	*R.* kl. *esculenta*
Варианты трансплантации	$RR_x \leftrightarrow RR_y$	$RL_x \leftrightarrow RL_y$	$RE_x \leftrightarrow RE_y$
Количество аллографтов	12	19	14
Средняя продолжительность латентной фазы, сут	17,583 ± 0,981	20,053 ± 1,115	23,143 ± 1,309*
Min—Max	10—22	11—29	16—27
CV	19,320	24,231	21,160
Среднее время выживания графтов, сут	63,222 ± 6,920	62,632 ± 5,641	54,417 ± 3,615
Min—Max	29—94	34—97	41—83
CV	32,835	39,258	22,989
Скорость отторжения, коэффициент регрессии	0,075 ± 0,004	0,068 ± 0,006	0,095 ± 0,009*

* Различия статистически достоверны (по этим показателям гибрид отличается от озерной и прудовой лягушек).

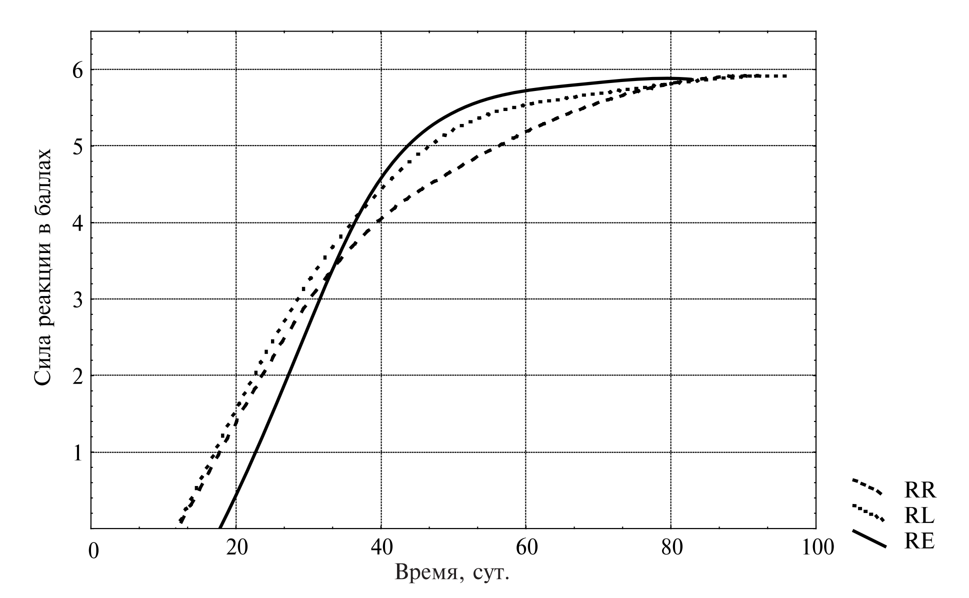


Рис. 1. Кривая процесса отторжения аллографтов у зеленых лягушек гибридного комплекса *Rana esculenta*.
Fig. 1. Graphical display of the rejection process of allografts in the *Rana esculenta* hybrid complex.

татов $RE_1 \leftrightarrow RE_2$ продолжительность выживания больше. По-видимому, различия в скорости отторжения у гибридов из Киевской обл. и юга Польши обусловлены их генетической структурой.

Более короткий период выживания графтов и соответственно большая скорость реакции у новобеличанских гибридов по сравнению с родительскими видами могут быть вызваны различиями в иммунном статусе видов и гибридных форм, а также явлением гетерозиса у гибридов со структурой F_1. Замечено, что стадию метаморфоза гибриды проходят быстрее (Semlitsch, 1993), и их головастики отличаются большими размерами, нежели у родительских видов (Hotz et al., 1999).

В целом анализ процесса аллотрансплантации кожи у зеленых лягушек (как внутри вида, так и при обмене графтов между гибридами аллодиплоидами) выявил различия по антигенам гистосовместимости, что проявилось в разных сроках начала отторжения. У гибридов деструктивные изменения аллографтов достоверно запаздывают по сравнению с родительскими видами. По-видимому, этот факт свидетельствует о снижении уровня генетической изменчивости у гибридов не только по аллозимной изменчивости, но и по антигенам гистосовместимости. Однако требуется еще провести исследования гибридов из популяций с различной генетической структурой.

Выводы

1. Все 3 группы зеленых лягушек, относящиеся к гибридному комплексу *Rana esculenta*, а именно: озерные (*R. ridibunda*), прудовые (*R. lessonae*), а также аллодиплоидные гибриды (*R. lessonae* х *R. ridibunda*) *R.* kl. *esculenta*, характеризуются определенной степенью полиморфизма по главному комплексу гистосовместимости.

2. Наиболее изменчивыми по антигенам тканевой совместимости являются виды. Гибриды отличаются длительной латентной фазой, следовательно, меньшей вариабельностью по антигенам гистосовместимости.

3. Скорость отторжения аллотрансплантатов выше у *R.* kl. *esculenta*, что может быть вызвано явлением гетерозиса у гибридов F_1 и иммунным статусом в целом.

Каунат X. Пересадка кожи // Иммунологические методы : Пер. с нем. — М. : Мир, 1979. — С. 177—181.

Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю. Генетические дефекты при наследовании и изменчивость локуса Ldh-B в гибридных популяциях Rana esculenta complex (Amphibia, Ranidae) // Изв. РАН. — 1994. — № 5. — С. 779—787.

Межжерин С. В., Песков В. Н. Биохимическая изменчивость и генетическая дифференциация популяций озерной лягушки Rana ridibunda Pall. // Цитология и генетика. — 1992. — **26**, № 1. — С. 43—48.

Морозов-Леонов С. Ю. Генетичні процеси в гібридних популяціях зелених жаб (Rana esculenta L. complex) України : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 1998. — 16 с.

Berger L. Biometrical studies on the population of green frogs from the environs of Poznan // Ann. zoologici. — 1966. — **23**, N 11. — P. 303—324.

Dubois A., Günther R. Klepton and synklepton: two new evolutionary systematics categories in zoology // Zoologische Jahrbücher (Systematik). — 1982. — N 109. — S. 290—305.

Góralik E., Labuz D., Jözkowicz A., Płytycz B. Studies on transplantation immunity of the Yellow-Bellied Toad Bombina variegata // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. — 1994. — N 42. — P. 141—146.

Günther R. Der Karyotyp von Rana ridibunda Pall. und das Vorkommen von Triploidie bei Rana esculenta L. (Anura, Amphibia) // Biologisches Zentralblatt. — 1970. — **89**, N 3. — S. 327—342.

Heppich S., Tunner H. G. Chromosomal constitution and C-banding in homotypic Rana esculenta crosses // Mitt. Zool. Mus. Berlin, 1979. — **55**, N 1. — S. 111—114.

Hildemann W. H., Haas R. Homotransplantation immunity and tolerance in the bullfrog // J. Immunol. — 1959. — **83**, N 5. — P. 478—485.

Hotz H., Semlitsch R. D., Gutmann E. et al. Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclonal frog hybrids // Evolution. — 1999. — **96**, N 5. — P. 2171—2176.

Mazin A. L., Borkin L. J. Nuclear DNA content in green frogs of the genus Rana // Mitt. Zool. Mus. Berlin. — 1979. — **55**, N 1. — S. 217—224.

Płytycz B. Differential polymorphism of the amphibian MHC // Dev. Comp. Immunol. — 1984. — N 8. — P. 727—732.

Płytycz B., Semik D. Rejection of skin allo- and xenografts in the grass frog, Rana temporaria and the edible frog, Rana esculenta // Arch. immunol. et therapiae experimentalis. — 1980. — N 28. — P. 625—634.

Semik D. Comparison of reactions to skin grafts in green frogs: Rana lessonae Cam., R. esculenta L. and R. ridibunda Pall. // Arch. immunol. et therapiae experimentalis. — 1983. — N 31. — P. 429—436.

Semlitsch R. D. Adaptive genetic variation in growth and development of tadpoles of the hybridogenetic Rana esculenta complex // Evolution. — 1993. — **47**. — P. 1805—1818.

Tunner H. G. Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation // Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch. — 1974. — **12**. — S. 309—314.